

文章编号: 0454-6296 (2000) 01-0013-08

丝裂霉素 C 和二甲基亚砷对家蚕核型多角体病毒 (BmNPV) 的诱变

曹 阳¹, 黄自然¹, 葛慈斌¹, 刘良式², 王春新²

(1. 华南农业大学蚕桑系, 广州 510642; 2. 中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要: 该文报道强诱变剂丝裂霉素 C (MMC) 和化学溶剂二甲基亚砷 (DMSO) 在家蚕蛹体内对家蚕核型多角体病毒 (BmNPV) 的诱变结果。MMC 对 BmNPV 具有诱变效应: (1) 导致蚕蛹发病时间延迟, 发病死亡率下降, 有显著的剂量效应; (2) 部分病蛹体内发生异常形态多角体, 继代试验证实具有遗传稳定性。其中具对角线裂痕的四角形超大多角体 (15.0~30.0 μ m) 尚属首次发现; (3) 诱变的 BmNPV 多角体内部结构发生变化; (4) 诱变的 BmNPV-DNA 经 *Eco*RI、*Bgl*II 和 *Bam*HI 酶切消化, 其电泳图谱出现某些 DNA 泳带的增加或丢失。以上结果说明, MMC 可能诱导 BmNPV 基因组发生了多处位点的突变。DMSO 处理剂量在 9.0 μ L/蛹及其以下各剂量组, 对 BmNPV 无诱变效应。

关键词: 家蚕; 家蚕核型多角体病毒; 诱变; 丝裂霉素 C; 二甲基亚砷

中图分类号: Q319.33 **文献标识码:** A

家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV) 感染家蚕发生脓病^[1]。据此, 可以设计一个新的环境诱变剂对病毒诱变的研究方法: 将受试化学制剂与 BmNPV 一同注射接种于家蚕蛹, 分析在家蚕蛹体内代谢环境中化学物对 BmNPV 的诱变效应和诱变分子机理^[2]。其研究结果可为昆虫病毒的诱变遗传学、环境诱变剂的初筛和安全性评价、农业化学诱变育种提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料和仪器

供试家蚕品种为 9·芙 \times 7·湘, 化蛹 2~3 天的蚕蛹。BmNPV 野生型株系为华南农业大学蚕桑系保存。

丝裂霉素 C (MMC) 为日本协和发酵工业株式会社“MMC 协和 S”粉状制剂, 二甲基亚砷 (DMSO) 为 Merck-Schuchardt 公司产品。限制性内切核酸酶购自华美公司。

交变脉冲场电泳装置系 BIO-RAD 公司仪器: PULSEWAVETM760 电泳仪, MODEL 200/

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 A403 (950403)

收稿日期: 1997-08-25; 修订日期: 1999-01-11

2.0 POWER SUPPLY 电压仪和 CHEF·DR™ II 电泳槽。

1.2 野生型 BmNPV 的纯化制备

野生型 BmNPV 多角体经口接种 4 龄起蚕, 由患病蚕收集多角体粗品, 按曹阳等 (1997)^[2]方法: 通过 40% - 50% - 60% 蔗糖梯度密度离心纯化多角体, 取 5 mL 纯化的多角体 (2×10^9 多角体/mL) 低速离心后, 用 0.06 mol/L Na_2CO_3 、0.1 mol/L NaCl pH10.8 碱液裂解多角体蛋白, $80\,000 \times g$ 离心 1 h, 收集病毒沉淀, 用 0.85% NaCl 生理盐水溶解至 10 mL, 作为接种用的 BmNPV 原液, 分装后分别于 -4°C 短期保存和 -20°C 长期保存。

1.3 对 BmNPV 的诱变处理方法

BmNPV 的致病接种量: 取 1 份保存的 BmNPV 原液, 用生理盐水作倍比稀释, 测定其致病力为: 每蛹注射 10 μL 的 10 倍 BmNPV 稀释液, 室温 $25 \sim 28^\circ\text{C}$, 蚕蛹 4~5 天将全部发病。据此作为本次诱变试验的 BmNPV 致病接种量。

受试化学制剂导致蚕蛹中毒死亡的剂量: MMC 先用 DMSO 适量溶解 (DMSO 终浓度低于 10%, V/V), 再用生理盐水稀释配制成不同浓度。DMSO 直接用生理盐水配制。每蛹注射 10 μL , $25 \sim 28^\circ\text{C}$ 保存 4~5 天, 测定 MMC 和 DMSO 分别导致蚕蛹中毒死亡的剂量。

诱变处理的剂量设置: 以中毒死亡剂量的 1/2 剂量为上限, 对 MMC 和 DMSO 分别设置 5 个处理剂量, 每处理剂量设 3 个重复, 每重复的蚕蛹数 30~35 个, 注射体积为 10 μL /蛹。

对照区组设置: CK1 为空白对照, 不作任何处理; CK2 为阴性对照, 只注射 BmNPV; CK3 为校正对照, 只注射生理盐水。注射体积为 20 μL /蛹 (其中 CK2 为 10 μL BmNPV + 10 μL 生理盐水)。对照组重复与诱变处理组相同。

注射处理方法: 按曹阳等 (1997)^[2]报道的方法, 以 10 μL /蛹受试化学制剂与 10 μL /蛹 BmNPV 稀释液混合注射接种蚕蛹。高剂量 DMSO 注射体积大于 10 μL /蛹, 按表 1 剂量设置, 直接注射 DMSO 原液。注射后的蚕蛹于 $25 \sim 28^\circ\text{C}$ 灭菌室保存。

1.4 诱变 BmNPV 的继代方法

镜检收集异常形态多角体比率高的单个病蛹血淋巴, 获得多角体粗品。碱液裂解多角体后, 5 000 r/min 离心去除杂质, 上清加入 40% PEG 8 000 至终浓度 15% 和 5 mol/L NaCl 至终浓度 1.88 mol/L, 冰浴 1 h, 12 000 r/min 离心 10 min, 用生理盐水重悬病毒沉淀至 600 μL , 作为继代接种用的 BmNPV。按 10 μL /蛹单独注射接种蚕蛹。

1.5 BmNPV-DNA 的提取及限制性内切核酸酶酶切分析

合并收集 MMC 诱变组继代试验的病蛹血淋巴中的多角体, 按蔗糖梯度密度法纯化。取 600 μL 纯化多角体, 低速离心沉淀后, 用碱液裂解多角体。裂解液加入 15 μL 3 mol/L NaAc pH5.2 调节至 pH7.8。继之加入蛋白酶 K 或蛋白酶 E 至终浓度 400 $\mu\text{g/mL}$, 60°C 或 37°C 温育 1 h, 再加入 10% SDS 至终浓度 1%, 37°C 保温 2 h。用饱和酚:氯仿/异戊醇温和抽提 2~3 次后, 加入 1/10 体积 3 mol NaAc pH7.8 和 2 倍体积无水乙醇, 抽提液中即析出 BmNPV-DNA 絮状沉淀。用 75% 乙醇对 BmNPV-DNA 絮状沉淀洗涤离心 2~3 次后, 溶于 TE 缓冲液中。继代野生型株系 BmNPV-DNA 抽提方法相同。

以上两种 BmNPV-DNA, 分别用 *EcoR* I、*Bgl* II 和 *Bam* H I 消化, 1.0% 琼脂糖制凝胶, 进行交变脉冲场电泳: 脉冲设置为 5:8 s; 电压: 160 V; 时间: 16 h, 观察酶切图谱变化。

表 1 MMC、DMSO 分别与 BmNPV 混合注射接种蚕蛹后的蛹存活率和发病死亡率（第 4 天）

Table 1 Survival rate and diseased mortality of the silkworm pupae injected with MMC/DMSO and BmNPV (the fourth day)

MMC					DMSO				
剂量 ^① (μg/蛹)	供试蛹总 数 ^② (N)	存活率 ^③ (%)	校正存活 率 ^④ (%)	校正死亡 率 ^⑤ (%)	剂量 ^① (μL/蛹)	供试蛹总 数 ^② (N)	存活率 ^③ (%)	校正存活 率 ^④ (%)	校正死亡 率 ^⑤ (%)
		(x̄ ± SD)		(x̄ ± SD)			(x̄ ± SD)		(x̄ ± SD)
0.5	96	25.05 ± 8.53	28.42	71.58 ± 9.68**	1.0	87	5.67 ± 3.75	6.43	93.56 ± 4.26
1.5	92	28.35 ± 10.81	32.17	67.83 ± 12.27**	3.0	84	7.14 ± 3.57	8.10	91.90 ± 4.05
4.5	96	41.79 ± 6.10	47.42	52.58 ± 6.92**	9.0	92	9.75 ± 3.12	11.06	88.93 ± 3.54
13.5	95	60.23 ± 5.50	68.34	31.66 ± 6.23**	27.0	91	14.23 ± 4.74	16.15	83.86 ± 5.38*
40.5	94	89.45 ± 4.59	100.00	0.00	50.0	92	0.00	中毒死亡 poisoned	中毒死亡 poisoned

①Dosage (μg/pupa); ②No. of pupae tested (N); ③Survival rate (%); ④Corrective survival rate (%); ⑤Corrective mortality (%); ⑥Dosage (μL/pupa);

1. 校正存活率和校正死亡率由 CK3（生理盐水组）存活率 88.13% (q_0) 按 Abbott 公式^[3]计算获得：校正死亡率 (%) = $q_0 - q/q_0 \times 100\%$ [According to the calculation of the formula by Abbott^[3], both the corrective survival rate and the corrective mortality are obtained; Corrective mortality (%) = $q_0 - q/q_0 \times 100\%$. $q_0 = 88.13\%$ (Survival rate of physiological saline group, CK3)];

2. CK2（只注射接种病毒组）校正死亡率为 90.34%；* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ (t 测验) [CK2 (injected with BmNPV only); corrective mortality (%) = 90.34%；* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ (t -test)]

2 结果

2.1 MMC 和 DMSO 对 BmNPV 的诱变效应

按照家蚕蛹-BmNPV 系统诱变研究方法的设计原理，受试化学制剂与 BmNPV 混合注射接种蚕蛹后，如果受试化学制剂对 BmNPV 具有诱变效应，蚕蛹发病时间应明显延迟，发病死亡率的下降呈现剂量效应。

图 1 显示，混合注射接种后 3~6 天，蚕蛹发病死亡率（系累计发病死亡率，后同）随时间变化的上升趋势，在 DMSO 为 9.0μL/蛹剂量组，与 CK2 相同；而在 MMC 为 4.5μg/蛹剂量组，则比 CK2 明显滞后 1 天。由表 1 结果可以看出，在注射接种后的第 4 天，MMC 处理组随剂量增高，蚕蛹发病死亡率下降，具有统计学上显著的剂量效应；DMSO 处理组在 9.0μL/蛹及其以下各剂量，蚕蛹发病死亡率的变化没有统计学差异。以上结果说明，MMC 对 BmNPV 具有强的诱变效应，减弱了蛹体内 BmNPV 的致病力。

2.2 MMC 诱导 BmNPV 产生异常形态多角体

用 BmNPV 继代野生型株系感染蚕蛹，产生的多角体为六角形十八面体，大小 2.0~4.0 μm，平均(3.2 ± 0.685)μm，偶有其它形态多角体发生（低于 5.0%），符合野生型 BmNPV 多角体的形态、大小特征^[1]（图版 I：4、5）。

MMC 与 BmNPV 共同注射接种蚕蛹，镜检病蛹血淋巴，发现部分病蛹出现异常形态多

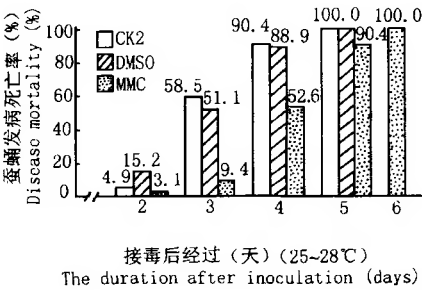


图 1 MMC 和 DMSO 分别与 BmNPV 混合注射蚕蛹后对发病时间的影响

Fig. 1 Infective period of the silkworm pupae injected with MMC or DMSO + BmNPV
CK2: 只注射 BmNPV (only injected with BmNPV);
DMSO: 9.0 μL/蛹 (9.0 μL/pupae);
MMC: 4.5 μg/蛹 (4.5 μg/pupae)

2.3 MMC 诱导 BmNPV 多角体内部结构发生变化

由透射电镜超薄切片观察，MMC 诱变的 BmNPV 多角体内部包埋病毒粒子的结构特征见图版 II。野生型对照株 BmNPV 的多角体，外部为电子云密度均匀的多角体蛋白，内部为电子云高度致密较均匀的多角体蛋白，其间随机分布被包埋的杆状病毒粒子（图版 II：1、2）。MMC 诱变的 BmNPV 多角体，大多数内部结构发生变化，电子云密度很不均匀，呈多空泡状，杆状病毒粒子随机分布在空泡周缘（图版 II：3、4），提示 MMC 对 BmNPV 基因组的诱变，可能引起多角体蛋白的包埋结构发生了改变。

2.4 MMC 诱导 BmNPV 基因组限制性内切核酸酶酶切片段的变化

用限制性内切核酸酶 *Eco*RI、*Bgl*II 和 *Bam*HI 消化野生型株系 BmNPV-DNA，经交变脉冲场电泳后分别显示 6、8、6 条酶切泳带（图 2、图 3）。但由 MMC 诱变的 BmNPV-DNA，经酶切后的电泳图谱则出现某些 DNA 片段的增加或丢失：（1）*Eco*R I 酶切多出 10.0 kb 和 7.1 kb 两条泳带，在相应于对照组 3.4 kb 位置则发生泳带的丢失（图 2：A），随着 DNA 酶切后的点样量浓度增加，在此位置才可能看见弱的泳带（图 2：B），说明诱变的大多数 BmNPV 的基因组在此 *Eco*RI 位点发生了丢失。（2）在 *Bgl* II 的酶切电泳图谱中，多出一条 6.9 kb 泳带，但相应于对照的 3.8 kb 和 2.5 kb 泳带丢失（图 3：5、6）。（3）由 *Bam*HI 酶切后，4.6 kb 泳带丢失（图 3：9、10）。根据 Iatrou 等（1985）^[6]报道的野生型株系 BmNPV 多角体蛋白基因及其附近区域的 DNA 序列（2 060 bp），用软件 DNASIS 分析它的全部限制性内切核酸酶位点，表明在此区域没有 *Eco*RI、*Bgl*II 和 *Bam*HI 酶切位点。因而，经 MMC 诱变的大多数 BmNPV 的基因组，可能发生了多处碱基位点的突变。对上述三种限制性内切核酸酶酶切后增加或丢失泳带之间的酶切位点变化关系，以及这些酶切位点变化是否与诱变处理的 BmNPV 多角体形态变异有关，尚待继续研究。

角体，发生率为 10%～30%，个别病蛹高达 40%左右。由光镜和扫描电镜观察，异常形态多角体除有已报道过的四角形^[4,5]之外，主要为非对称形、正常型缺损、有裂痕多裂体和不定形超大多角体（图版 I：1～3、6～8）；多角体大小可划分为三组：2.0～4.0 μm、5.0～10.0 μm、15.0～30.0 μm，其中具有对角线裂痕的四角形超大多角体（15.0～30.0 μm）（图版 I：8）尚属首次发现。由一些多裂体正在裂开的形态分析，某些非对称形和正常型缺损多角体可能是多裂体等不稳定形态的裂解产物（图版 I：1、3、6～8）。上述结果说明，MMC 可能提高了 BmNPV 基因组的突变率，其中一个诱变特征就是出现高比率的各种异常形态多角体。在诱变 BmNPV 的继代试验中，异常形态多角体比率为 20.6%～28.7%，说明具有遗传稳定性。

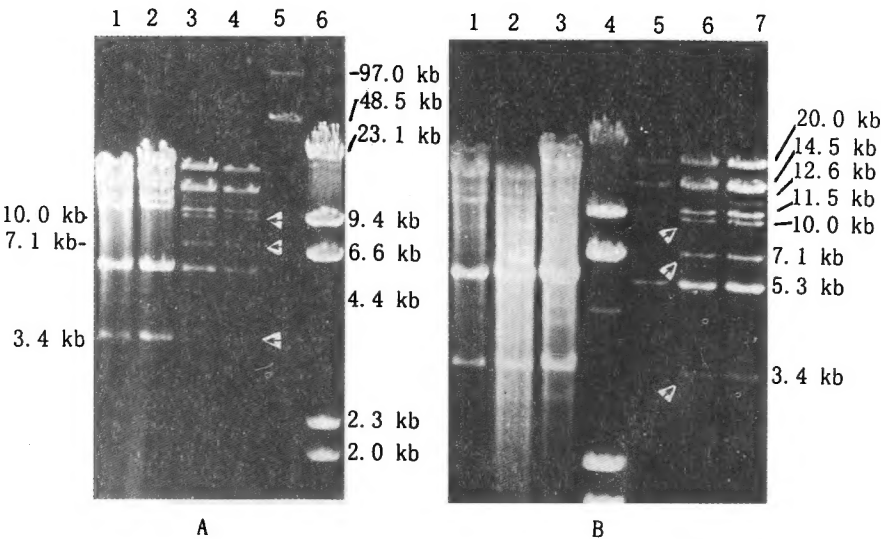


图2 MMC 诱变的 BmNPV-DNA 经 *Eco*RI 酶切的交变脉冲场电泳图谱
Fig.2 *Eco*RI restriction endonuclease pattern of the BmNPV-DNA induced by MMC in pulsed-field gel electrophoresis

A 1~2: 对照 (Control) BmNPV-DNA/*Eco*RI; 3~4: MMC/BmNPV-DNA/*Eco*RI;
5: 分子量标准 (Marker): λ DNA 的单体和二聚体分子 (Monomer and dyad of λ DNA);
6: 分子量标准 (Marker): λ DNA/*Hind*III
B 1~3: 对照 (Control) BmNPV-DNA/*Eco*RI; 4: 分子量标准 (Marker): λ DNA/*Hind*III;
5~7: MMC/ BmNPV-DNA/*Eco*RI

3 讨论

陈长乐等 (1989)^[4]、岩下嘉光 (1993)^[5]分别由感染的脓病蚕分离到遗传上均一，能继代保存的 BmNPV 不同变异株系，说明野生型 BmNPV 存在低频率的自发突变。MMC 为公认的强诱变剂，主要作用是导致 DNA 交联、断裂和点突变^[7,8]。在本试验中，MMC 对 BmNPV 显示强的诱变效应，导致多角体出现高比率的形态改变和内部结构变化，病毒 DNA 酶切图谱异常。野口洋子 (1995)^[9]曾用 5-溴-脱氧尿苷诱变 BmNPV，获得温度敏感型和多角体形态变异的突变株系。这些结果说明，化学诱变剂可以提高野生型 BmNPV 的突变发生率。至于本试验中 MMC 导致 BmNPV-DNA 酶切图谱的变化是否与多角体形态、大小和内部结构异常有关，需要继续研究。目前已采用 PCR 扩增诱变靶基因直接测序的方法，查明了 MMC 对 BmNPV 多角体蛋白基因的诱变位点，其结果将整理后另文报道。

DMSO 作为阴性有机溶剂，常用于诱变测试中的受试化学制剂的溶解。但近些年来有报道，DMSO 在高剂量对病毒、细菌具有弱的致突变性^[10~12]。本次试验 DMSO 在 27.0 μ L/ 蛹

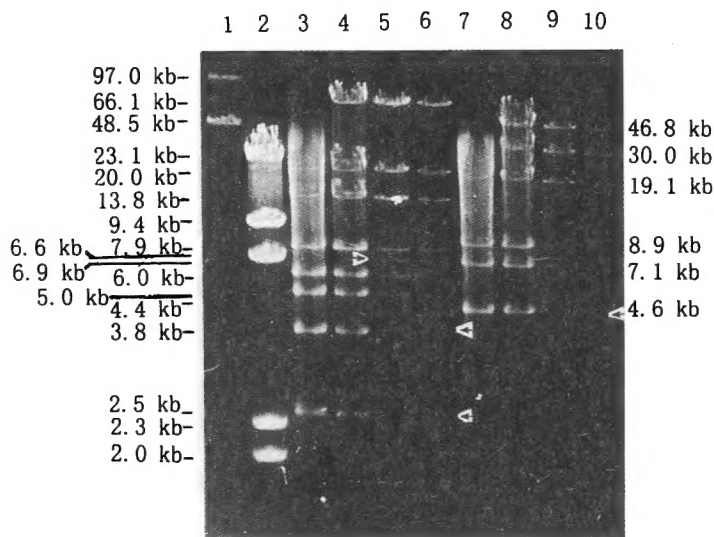


图3 MMC诱变的BmNPV-DNA经*Bgl*II、*Bam*HI酶切的交变脉冲场电泳图谱
Fig.3 *Bgl*II and *Bam*HI restriction endonuclease patterns of the BmNPV-DNA induced by MMC in pulsed-field gel electrophoresis

- 1: 分子量标准 (Marker): λ DNA 的单体和二聚体分子 (Monomer and dyad of λ DNA);
2: 分子量标准 (marker): λ DNA/*Hind*III; 3~4: 对照 (Control) BmNPV-DNA/*Bgl*II;
5~6: MMC/BmNPV-DNA/*Bgl*II; 7~8: 对照 (Control) BmNPV-DNA/*Bam*HI;
9~10: MMC/BmNPV-DNA/*Bam*HI

剂量组, 对 BmNPV 可能具有弱的遗传毒性, 又一次证实了上述文献报道。

致谢 华南农业大学蚕桑系徐兴耀教授、黄亚东博士生, 生物技术学院杨秉耀高级工程师对本研究部分工作给予了热心帮助。谨此致谢。

参 考 文 献 (References)

- [1] 中国农业科学院蚕业研究所主编. 中国养蚕学. 上海: 上海科学技术出版社. 1991, 549~554
- [2] 曹 阳, 徐兴耀, 黄自然等. 由家蚕蛹-BmNPV 系统建立环境诱变剂检测分析模型的初步研究. 蚕业科学, 1997, 23(4): 202~206
- [3] 深见顺一, 上杉康彦等编. 农药实验方法——杀虫剂篇. 章元寿译. 北京: 农业出版社. 1994, 85~90
- [4] 陈长乐, 杨吉成, 李敏棠等. 家蚕核型多角体病毒突变株的研究. 病毒学杂志, 1989, 3: 285~291
- [5] 岩下嘉光. 核多角体病ウイルス変異株の増殖相と抗原の分析 (研究成果报告书). 日本宇都宫大学农学部, 1993, 3~21
- [6] Iatrou K, Ito K, Witkiewicz H. Polyhedrin gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. J. Virol., 1985, 54: 436~445

- [7] Kier L E. The *Salmonella typhimurium*/mammalian microsomal assay, A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 1986, 168 (2): 69~240
- [8] 黄幸纡, 陈星若主编. 环境化学物致突变致畸变致癌试验方法. 杭州: 浙江科学技术出版社. 1985, 13~39
- [9] 野口洋子. カイコ核多角体病ウィルス温度感受性突然変異株の培養細胞および幼虫における増殖. 日蚕雑, 1995, 64(3): 230~236
- [10] Nakamura S, Oda Y, Ugawa M. Induction of *umu* gene expression in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 by dimethyl sulfoxide (DMSO). *Mutat. Res.*, 1990, 229: 11~15
- [11] Hakura A, Mochida H, Yamatsu K. Dimethyl sulfoxide (DMSO) is mutagenic for bacterial mutagenicity tester strains. *Mutat. Res.*, 1993, 303: 127~133
- [12] 曹 阳, 胡维民, 曹 佳等. 二甲基亚砜在 λ 重包装法中的遗传毒性研究. 卫生毒理学杂志, 1996, 10(1): 40~42

Mutagenesis of nuclear polyhedrosis virus (NPV) induced by mitomycin C (MMC) and dimethyl sulfoxide (DMSO) in the silkworm, *Bombyx mori*

CAO Yang¹, HUANG Zi-ran¹, GE Ci-bin¹, LIU Liang-shi², WANG Chun-xin²

(1. Department of Sericulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642; 2. School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract: This paper deals with the effect of mutation on the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) induced by mitomycin C (MMC) and dimethyl sulfoxide (DMSO) in the pupa of the silkworm. MMC is a mutagenic substance to BmNPV: (1) There was significant dosage effect upon the delay of infective period and the decrease of pupal mortality; (2) Morphological changes of the polyhedra were observed in some diseased pupae and their hereditary stability was testified in the next generation. Some polyhedra with extraordinary large size (15.0~30.0 μm) having diagonal fission on the square surface were observed for the first time; (3) Structural changes were found within the mutated polyhedra and (4) The mutated BmNPV-DNA were digested by *Eco*RI, *Bgl*II and *Bam*HI, their electropherogram depicted the occurrence of some additional bands and the absence of other bands. These results show that MMC could induce the genome of BmNPV to mutate at many loci. DMSO does not induce mutagenesis in BmNPV with dosage below 9.0 μL /pupae.

Key words: silkworm; BmNPV; mutagenesis; MMC; DMSO

图版说明 (Explanation of Plates)

图版 I (Plate I)

MMC 诱变 BmNPV 发生的异常形态多角体光镜和扫描电镜观察

Micrograph and electron micrograph of abnormal polyhedra of the BmNPV induced by MMC

1、2、3: MMC 诱变组原代 BmNPV 多角体 (Primary polyhedra of the mutated group with MMC);

4、5: CK2 对照组继代 BmNPV 多角体 (Successive polyhedra of the control group CK2);

6、7、8: MMC 诱变组继代 BmNPV 多角体 (Successive polyhedra of the mutated group with MMC);

光镜: $200\times$ (Microscope: $200\times$); 扫描电镜: $2\,000\times$ (8: $1\,000\times$) (Electron microscope: $2\,000\times$ (8: $1\,000\times$)); 标尺 = $10\,\mu\text{m}$ (Bar = $10\,\mu\text{m}$);

多角体大小: 正常为 $2.0\sim 4.0\,\mu\text{m}$; 异常为 $5.0\sim 10.0\,\mu\text{m}$ (8: $15.0\sim 30.0\,\mu\text{m}$) [Normal size: $2.0\sim 4.0\,\mu\text{m}$; Abnormal size: $5.0\sim 10.0\,\mu\text{m}$ (8: $15.0\sim 30.0\,\mu\text{m}$)];

箭头示各种类型的 BmNPV 异常形态多角体 [The arrow shows all kinds of abnormal polyhedra of the BmNPV]

图版 II (Plate II)

MMC 诱变的 BmNPV 多角体内部结构变化的电镜观察

Electron micrograph of structural change inside the polyhedra of the BmNPV induced by MMC

1 ($3\,900\times$)、2 ($14\,000\times$): CK2 对照组继代 BmNPV 多角体 (Successive polyhedra of the control CK2);

3 ($3\,900\times$)、4 ($14\,000\times$): MMC 诱变组继代 BmNPV 多角体 (Successive polyhedra of the mutated group with MMC);

标尺 = $1\,\mu\text{m}$ (Bar = $1\,\mu\text{m}$)

